

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 27/06/2023.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

EFEITO DE DOSE LETAL E SUBLETAL DO HERBICIDA GLIFOSATO NO
TRANSCRIPTOMA DE ABELHAS *Apis mellifera* AFRICANIZADAS NA FASE DE
CAMPEIRAS

JAINÉ DA LUZ SCHEFFER

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Zootecnia como parte das
exigências para obtenção do título de Mestre
em Zootecnia

BOTUCATU – SP
Junho, 2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

EFEITO DE DOSE LETAL E SUBLETAL DO HERBICIDA GLIFOSATO NO
TRANSCRIPTOMA DE ABELHAS *Apis mellifera* AFRICANIZADAS NA FASE DE
CAMPEIRAS

JAINÉ DA LUZ SCHEFFER

Orientador: Prof. Dr. Orientador Ricardo de Oliveira Orsi

Coorientador: Dr. Samir Moura Kadri

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Zootecnia como parte das
exigências para obtenção do título de Mestre
em Zootecnia

BOTUCATU – SP
Junho, 2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Scheffer, Jaine da Luz.

Efeito de dose letal e subletal do herbicida glifosato no transcriptoma de abelhas *Apis mellifera* africanizadas na fase de campeiras / Jaine da Luz Scheffer. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Ricardo de Oliveira Orsi

Coorientador: Samir Moura Kadri

Capes: 50405004

1. Agroquímicos. 2. Herbicidas. 3. Expressão gênica.
4. Criação de abelhas. 5. Glifosato.

Palavras-chave: Agrotóxicos; Apicultura; Expressão gênica; Herbicida.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Jaine da Luz Scheffer, nascida em 21 de agosto de 1996 na cidade de Torres/RS, é filha de Jair Maier Scheffer e Alzeni Matos da Luz Scheffer. Ingressou no curso de Zootecnia na Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA, Campus de Dom Pedrito/RS, em março de 2015 e graduou-se em fevereiro de 2020. Em agosto de 2020 iniciou o curso de Mestrado em Zootecnia na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita “Filho” – UNESP – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu/SP, onde foi bolsista temporária pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/CAPES e posteriormente, até a conclusão do curso, pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq.

À minha filha, que mesmo sem saber, me encoraja todos os dias, sendo meu maior incentivo para seguir em frente.

Aos meus pais que me ensinaram a valorizar cada oportunidade e nunca deixaram de me apoiar.

Dedico com amor

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais, Jair Maier Scheffer e Alzeni Matos da Luz Scheffer, que me incentivaram a ir em busca de um futuro melhor, nunca mediram esforços para investir na minha educação. Serei eternamente grata por todo cuidado e carinho com a Ísis para que eu pudesse estar concluindo mais uma etapa da minha vida, foram fundamentais para eu chegar até aqui.

Ao meu irmão, Adilso Matos da Luz, que mesmo distante, nunca deixou de estar ao meu lado.

À minha filha, Ísis da Luz Scheffer, que é tudo na minha vida, minha força e o motivo de eu ir em busca de um futuro promissor para nós duas.

Ao Prof. Dr. Ricardo de Oliveira Orsi, pela orientação, amizade e apoio, tanto na vida profissional, quanto pessoal. Agradeço imensamente pela confiança depositada e pela oportunidade para realização desta dissertação. Muito obrigado pela paciência, dedicação, compreensão e por fazer crescer ainda mais o meu encanto pelas abelhas.

Ao Dr. Samir Moura Kadri, pelo auxílio nos estudos de expressão gênica, ensinamento na área de genética molecular e pela total dedicação a esta pesquisa. Grata pelo apoio e amizade.

Aos amigos de Pós-graduação, em especial a Isabella Lippi, Juliana Lunardi, Paulo Ito e Yan Souza Lima, pelo companheirismo e amizade ao longo desta etapa.

Ao grupo NECTAR – Núcleo de ensino, ciência e tecnologia em apicultura racional, que me proporcionou inúmeros aprendizados; aos integrantes que me ajudaram de certa forma na execução do projeto. Obrigada também pela amizade e experiências compartilhadas.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia FMVZ – UNESP, Câmpus de Botucatu, bem como ao Programa de Pós-graduação pelos ensinamentos e oportunidades.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pela bolsa de estudo à mim concedida.

E finalmente agradeço a Deus, que me enviou forças para superar as dificuldades e colocou pessoas certas em meu caminho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

*“Abelha no néctar da flor, bebê no seio materno,
renovação da vida, amor”!*

Djalma CMF

RESUMO GERAL

As abelhas são consideradas eficientes agentes polinizadores, e devido a sua característica generalista na busca de recursos alimentares disponibilizados pelas plantas, ficam sujeitas a situações desfavoráveis encontradas no ambiente, como os agrotóxicos. Dentre eles, o herbicida glifosato tem seu uso autorizado na maioria das culturas, sendo o mais comercializado nacionalmente. Diante disso, objetivou-se com o presente estudo, avaliar a toxicidade do glifosato a partir de alterações no perfil de expressão gênica de abelhas *Apis mellifera* africanizadas campeiras por meio de teste de ingestão. Para isso, abelhas recém-emergidas de nove colônias foram marcadas na região do pronoto e devolvidas às suas respectivas colônias; após 21 dias, 180 abelhas no total foram coletadas das colônias experimentais. Para os testes de ingestão, estas abelhas foram acondicionadas em placas Petri perfuradas, onde se mantiveram em jejum por 3 horas, totalizando seis repetições com cinco abelhas cada, sendo fornecido então o xarope de mel contendo ou não a dose letal (273,93 µg/abelha) e subletal do glifosato (2,73 µg/abelha). Após 1 e 4 horas de exposição, 15 abelhas foram coletadas aleatoriamente para as análises do transcriptoma do tecido cerebral. O RNA total de cada tratamento foi extraído pelo método de Trizol. Os genes diferencialmente expressos (DEGs) que apresentaram significância estatística foram considerados quando p-valor ajustado para múltiplas comparações $< 0,05$ e $|\log_2 FC| \geq 2$. Após a exposição das abelhas ao alimento contendo glifosato, 691 genes foram diferencialmente expressos após uma hora, sendo 404 genes para a dose letal e 538 genes para a dose subletal, com 251 genes expressos em comum para ambas as doses do herbicida. Após quatro horas de exposição das abelhas, foram diferencialmente expressos 499 genes para a dose letal e 483 genes para a dose subletal, totalizando 784 genes diferencialmente expressos, sendo 198 genes expressos para ambas as doses. Observou-se que, independente da dose utilizada, o herbicida glifosato promoveu alterações na expressão de genes relacionados a importantes vias do sistema nervoso das abelhas na fase de campeiras após uma hora de exposição. Após quatro horas de exposição, observou-se mudanças na expressão de genes relacionados a processos metabólicos e também a organelas intracelulares. Pode-se concluir que o herbicida glifosato afeta a expressão gênica de abelhas campeiras expostas de forma aguda, podendo interferir na sua microbiota intestinal, imunidade, sistema cognitivo e, consequentemente, no desenvolvimento da colônia.

Palavras-chave: agrotóxicos; apicultura; expressão gênica; herbicida.

ABSTRACT

Bees are considered efficient pollinating agents, and due to their generalist characteristic in the search for food resources made available by plants, they are subject to unfavorable situations found in the environment, such as pesticides. Among them, the herbicide glyphosate has its use authorized in most crops, being the most commercialized nationally. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the toxicity of glyphosate from changes in the gene expression profile of Africanized field bees *Apis mellifera* by means of an ingestion test. For that purpose, newly emerged bees from nine colonies were marked in the pronotum region and returned to their respective colonies; after 21 days, a total of 180 bees were collected from the experimental colonies. For the ingestion tests, these bees were placed in perforated Petri dishes, where they were maintained fasting for 3 hours, totaling six repetitions with five bees each, and then the honey syrup was supplied with or without the lethal dose (273, 93 µg/bee) and sublethal glyphosate (2,73 µg/bee). After 1 and 4 hours of exposure, 15 bees were randomly collected for brain tissue transcriptome analysis. Total RNA from each treatment was extracted by the Trizol method. The differentially expressed genes (DEGs) that showed statistical significance were considered when p-value adjusted for multiple comparisons $< 0,05$ and $|\log_2 FC| \geq 2$. After exposure of the bees to the food containing glyphosate, 691 genes were differentially expressed after one hour, 404 genes for the lethal dose and 538 genes for the sublethal dose, with 251 genes expressed in common for both doses of the herbicide. After four hours of exposure of the bees, 499 genes were differentially expressed for the lethal dose and 483 genes for the sublethal dose, totaling 784 differentially expressed genes, with 198 genes expressed for both doses. It was observed that, regardless of the dose used, the herbicide glyphosate promoted changes in the expression of genes related to important pathways in the nervous system of bees in the forager stage after one hour of exposure. After four hours of exposure, changes were observed in the expression of genes related to metabolic processes and also to intracellular organelles. It can be concluded that the herbicide glyphosate affects the gene expression of acutely exposed forager bees, which may interfere with their intestinal microbiota, immunity, cognitive system and, consequently, the development of the colony.

Keywords: pesticide; beekeeping; gene expression; herbicide.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

Figura 1. Castas encontradas em uma colônia de <i>Apis mellifera</i>	14
Figura 2. Fórmula estrutural do herbicida Glifosato [N-(phosphonomethyl)glycine]	22
Figura 3. Representação do mecanismo de ação do glifosato na planta por meio da rota do ácido chiquímico. (A) Via do ácido chiquímico com suas respectivas reações químicas sem a atuação do glifosato, com a formação de aminoácidos aromáticos (aa aromático); (B) Via do ácido chiquímico com a atuação do glifosato impedindo ação da enzima EPSPs por competição com o PEP (fosfoenolpiruvato); (1) enzima 5enolpiruvilshiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPs)	23

CAPÍTULO 2

Figura 1. Diagrama de Venn do número de genes diferencialmente expressos (DEGs) entre os grupos experimentais expostos ao glifosato após o período de uma hora (A) e quatro horas (B) em dose letal (IG50) e subletal (IGSUB) em comparação ao grupo controle.	51
Figura 2. Histograma do número de genes diferencialmente expressos (DEGs) infraregulados e supraregulados entre os grupos experimentais expostos ao glifosato após o período de uma (A) e quatro horas (B) em dose letal (IG50) e subletal (IGSUB) em comparação ao grupo controle.	52
Figura 3. Análise de ontologia gênica (GO) dos grupos experimentais após uma hora de exposição a dose letal do glifosato. A cor vermelha indica processos biológicos (BP), a cor verde indica componentes celulares (CC) e a cor azul indica funções molecular (MF).	53
Figura 4. Análise de ontologia gênica (GO) dos grupos experimentais após uma hora de exposição a dose subletal do glifosato. A cor vermelha indica processos biológicos (BP), a cor verde indica componentes celulares (CC) e a cor azul indica funções molecular (MF)	54

Figura 5. Análise de ontologia gênica (GO) da interseção dos grupos experimentais após uma hora de exposição a dose letal e subletal do glifosato. A cor vermelha indica processos biológicos (BP), a cor verde indica componentes celulares (CC) e a cor azul indica funções moleculares (MF). 55

Figura 6. Análise de ontologia gênica (GO) dos grupos experimentais após quatro horas de exposição a dose letal. A cor vermelha indica funções moleculares (MF). 56

Figura 7. Análise de ontologia gênica (GO) dos grupos experimentais após quatro horas de exposição a dose subletal do glifosato. A cor vermelha indica processos biológicos (BP), a cor verde indica componentes celulares (CC) e a cor azul indica funções moleculares (MF). 57

Figura 8. Análise de ontologia gênica (GO) da interseção dos grupos experimentais após quatro horas de exposição a dose letal e subletal do glifosato. A cor vermelha indica processos biológicos (BP), a cor verde indica componentes celulares (CC) e a cor azul indica funções moleculares (MF). 58

Figura 9. Análise de agrupamento dos genes diferencialmente expressos em comum após 1 hora de exposição entre as doses utilizadas (letal: IG50 e subletal: IGSUB) e grupo controle. 60

Figura 10. Análise de agrupamento dos genes diferencialmente expressos em comum após 4 horas de exposição entre as doses utilizadas (letal: IG50 e subletal: IGSUB) e grupo controle. 61

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Fases do ciclo de desenvolvimento das diferentes castas de uma colônia de <i>Apis mellifera</i>	15
--	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Consumo médio do xarope de mel ($\mu\text{L}/\text{abelha}$) contaminado ou não com a dose letal ($273,93 \mu\text{g}/\text{abelha}$) e subletal ($2,73 \mu\text{g}/\text{abelha}$) do glifosato pelas abelhas <i>Apis mellifera</i> africanizadas, durante 1 e 4 horas de exposição.....	50
--	----

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	13
Considerações Iniciais	14
1. Revisão de Literatura	14
1.1 Biologia das abelhas <i>Apis mellifera</i> , sua importância ambiental, social e econômica 14	
1.2 Agrotóxicos.....	18
1.3 Características gerais do herbicida glifosato.....	21
1.3.1 Efeitos do glifosato em abelhas	25
1.4 Genética molecular: técnicas de análises de expressão gênica.....	28
2. Objetivos Gerais	33
Referências	34
CAPÍTULO 2	43
RESUMO.....	44
ABSTRACT	45
1. Introdução	46
2. Material e Métodos	47
3. Resultados.....	50
3.1. Consumo do alimento	50
3.2. Genes diferencialmente expressos (DEGs) induzidos pelo glifosato	50
4. Discussão	62
Referências	68
ANEXOS	74
CAPÍTULO 3	75
IMPLICAÇÕES.....	76

4. Discussão

As abelhas operárias, a partir do vigésimo primeiro dia de vida assumem o papel de campeiras, dedicando-se exclusivamente à coleta de alimentos e produtos do campo para a colmeia (KILANI, 1999). Nesse período, o aprendizado de estímulos visuais e olfativos relacionados a fontes de alimentos e rotas de navegação se tornam fundamentais, refletindo em mudanças cerebrais (REINHARD e CLAUDIANOS, 2012). O sucesso da atividade de forrageamento é dependente desses processos de aprendizagem e memória desenvolvidos durante experiências vivenciadas por esses insetos, que ocorre normalmente ao visitar flores que oferecem néctar como recompensa (FARINA et al., 2019; TAN et al., 2022).

No presente estudo, observou-se que o glifosato modulou a expressão de genes tanto em 1 hora quanto em 4 horas após exposição, independente da dose utilizada do herbicida. Esses resultados demonstram a importância da realização de estudos utilizando doses subletais, as quais podem afetar o desenvolvimento larval e sua expressão gênica (VÁZQUEZ et al., 2018; VÁZQUEZ et al., 2020b). Os efeitos de concentrações subletais em abelhas demonstram também que estas tiveram a capacidade intelectual prejudicada, dificultando o seu retorno à colmeia, tendo a sensibilidade diminuída ao néctar e baixo desempenho de aprendizagem (HERBERT et al., 2014; BALBUENA et al., 2015). Além disso, estudos com outros agrotóxicos, como o fipronil, também utilizaram doses subletais e demonstraram efeitos prejudiciais às abelhas, desde seu desenvolvimento até a manutenção da colônia (ZALUSKI et al., 2015).

Este efeito prejudicial do glifosato pode ser reforçado pelo consumo semelhante do alimento pelas abelhas dos tratamentos, sugerindo que as concentrações utilizadas do herbicida não afetaram o seu consumo. A ausência do efeito no consumo de alimentos foi relatada anteriormente em abelhas expostas a diferentes concentrações (0,21 e 1,08 g/kg; 0,1 µg/L), sugerindo que o glifosato não apresenta efeito no paladar ou odor do alimento (BLOT et al., 2019; ALMASRI et al., 2021), podendo até promover aumento no consumo pelas abelhas na concentração 10 ppb (LIAO et al., 2017).

Analisando-se a exposição das abelhas ao herbicida após o período de uma hora, para ambas as doses, observaram-se mudanças significativas na expressão de genes relacionados a importantes vias do sistema nervoso, incluindo alterações de neurotransmissores, receptores, sinapses, complexo de íons e componentes de membrana.

Os genes OBP4 e OBP15 estão relacionados a família de genes da proteína de ligação ao odor e, além disso, desempenham função cognitiva nas abelhas (DENG et al., 2013; ZHAO

et al., 2020). O aumento em sua expressão após 1 e 4 horas de exposição ao glifosato, respectivamente, sugere que o herbicida alterou a sensibilidade do sistema olfativo e, com isso, a atividade de forrageamento também pode ser afetada, visto que as abelhas necessitam de aprendizagem e memória para navegação e identificação de recursos alimentares; desta forma, o aumento na expressão destes genes poderia ser uma tentativa de compensação do organismo das abelhas para restabelecer o funcionamento desses receptores olfativos. Diferentemente desses resultados, abelhas expostas a formulação comercial de glifosato apresentaram expressão de genes OBP infrareguladas, como OBP3, OBP9 e OBP15 tanto em *A. cerana cerana* quanto em *A. mellifera* (ZHAO et al., 2020), o que poderia reduzir a capacidade de estabelecer associações entre o odor e recompensa, necessitando de mais eventos de aprendizado para atingir níveis de respostas semelhantes as abelhas não contaminadas (HERBERT et al., 2014; LUO et al., 2021).

Para as sinapses correspondentes a aprendizagem olfativa dentro do cérebro das abelhas, são utilizados vários transmissores e receptores. Dentre os neurotransmissores, a acetilcolina (ACh) representa um neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC) e o glutamato na junção neuromuscular; a inibição é mediada via GABA e canais de cloreto controlados por glutamato (GAUTHIER e GRÜNEWALD, 2012).

A transmissão sináptica colinérgica (dependente de ACh) está envolvida na aquisição e recuperação dos processos cognitivos; para isso, existem pelo menos dois subtipos de receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) no cérebro das abelhas: dois β ($\beta 1-2$) e nove α ($\alpha 1-9$), sendo localizados cinco deles em neurópilos olfatórios ($\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 8$, $\alpha 7$, $\beta 1$). Os nAChRs de abelhas são receptores ionotrópicos, seletivos a cátions com alta permeabilidade ao Ca^{2+} e capazes de mediar a transmissão sináptica excitatória rápida (GAUTHIER e GRÜNEWALD, 2012).

Observou-se que a exposição das abelhas ao glifosato aumentou a expressão de duas subunidades nAChRs, sendo elas, nAChR $\alpha 1$ e nAChR $\alpha 7$, independentemente da dose e período. Este fato pode ser considerado uma resposta compensatória do organismo à perda funcional desses receptores no intuito de haver uma autorregulação pelo organismo, sugerindo que o glifosato pode afetar a aprendizagem tátil, olfativa e a memória de abelhas (ALIOUANE et al., 2009; CHRISTEN et al., 2016).

A enzima acetilcolinesterase (AChE), é responsável pela hidrólise desse neurotransmissor (ACh) nas regiões sinápticas das terminações nervosas (CASIDA e DURKIN, 2013; JOHNSON, 2014). Além disso, possui funções não neurológicas, atuando como uma molécula sinalizadora em resposta ao estresse (KIM et al., 2019). Observou-se que o gene

AChE-2 foi suprarregulado após o período de 1 hora de exposição ao glifosato. Desta forma, pode-se sugerir que o aumento de sua expressão pode ser uma tentativa de combater o agente estressor (glifosato) ou devido ao aumento da expressão dos receptores nicotínicos houve um consequente aumento da atividade enzimática na tentativa de restabelecer o repouso do neurônio.

O glifosato promoveu alterações nos canais de cloreto controlado por glutamato (GluCl) que estão envolvidos na neurotransmissão inibitória e na memória olfativa em abelhas, sendo expressos na maioria dos neurônios do lobo antenal (AL) de pupas e abelhas adultas (EL HASSANI et al., 2012; LEBoulLE, 2012). A suprarregulação desse gene pode ter sido mais uma iniciativa do organismo de restabelecer o repouso do neurônio, assim como AChE, podendo induzir prejuízos na memória olfativa destas abelhas.

A alteração de NRX-1 também mostrou efeitos devido ao glifosato exposto durante 1 hora na alimentação das abelhas. Este gene codifica proteínas transmembranares, conhecidas como neurexinas, que auxiliam na conexão dos neurônios durante a sinapse, estando localizadas na membrana pré-sináptica (REISSNER et al., 2013), predominantemente nos corpos de cogumelos (MBs) do cérebro de abelhas adultas, sugerindo um papel dessas moléculas na formação de sinapses associadas ao processamento sensorial e aprendizagem (REINHARD e CLAUDIANOS, 2012). A suprarregulação encontrada em nossos resultados também foram observadas em abelhas privadas de estímulos sensoriais, indicando mau funcionamento das conexões neurais, causando interferência entre as conexões durante a sinapse, afetando negativamente os comportamentos e o aprendizado das abelhas (BISWAS et al., 2010).

O Mblk-1 é expresso preferencialmente em um subtipo de neurônios chamado células Kenyon do tipo grande no MBs do cérebro das abelhas, sendo identificado como um fator de transcrição envolvido nos circuitos neuronais regulado por ecdisteróides (PAUL et al., 2006; TAKAYANAGI-KIYA et al., 2017). Além disso, esse subtipo também expressa genes envolvidos na sinalização de Ca^{2+} , incluindo proteína quinase II dependente de Ca^{2+} /calmodulina, que estão envolvidos em funções sinápticas (CaMKII) (MATSUMURA et al., 2022), especificamente na aprendizagem e memória de longo prazo (MAYACK et al., 2021). Genes relacionados à função neural, como CaMKII, são candidatos a gene alvo Mblk-1 em MBs de abelhas operárias e, portanto, acredita-se que Mblk-1 está envolvido no aprendizado e memória das abelhas através da regulação transcricional desse gene relacionado à plasticidade sináptica (MATSUMURA et al., 2022). Por esse motivo, ambos genes foram suprarregulados neste estudo, o que implica que as abelhas contaminadas necessitaram de maior nível de atividade desses genes para formar a memória de aprendizagem.

BRP e CAC também estão relacionados a sinapse em abelhas e foram suprarregulados neste trabalho, sendo BRP (bruchpilot) expresso após ambos períodos (1 e 4 horas) e CAC (cacofonia) apenas após 1 hora de exposição do glifosato às abelhas. BRP é uma proteína âncora pré-sináptica localizada nos MBs (GEHRING et al., 2017), e CAC é um gene do canal de cálcio que parece estar associado ao sistema nervoso de *Drosophila* desempenhando muitas regulações de curto e longo prazo no desenvolvimento neuronal, função e plasticidade (PENG e WU, 2007). Se a redução dos níveis de BRP em *Drosophila melanogaster* também resulta na redução em densidade dos canais de Ca^{2+} e da liberação de vesículas sinápticas, alterando a plasticidade de curto prazo, logo, o contrário também pode ser verdadeiro, em que o aumento de BRP pode resultar no aumento da densidade dos canais de Ca^{2+} e da liberação de vesículas sinápticas, alterando sua plasticidade, acarretando na liberação excessiva do transmissor tendo uma plasticidade sináptica não padronizada (KITTEL et al., 2006). Se a atividade neuronal é suprimida e/ou alterada, uma resposta compensatória coerente pode estar sendo desencadeada, aumentando a expressão desses genes neste trabalho.

BR-C, assim como Mblk-1, é expresso seletivamente nas células Kenyon do tipo grande dos corpos de cogumelo no cérebro do trabalhador, enquanto o E75 é expresso em todos os subtipos de neurônios do corpo de cogumelo, o que sugere que ambos estão envolvidos na regulação da função cerebral; também é possível, no entanto, que esses genes funcionem independentemente do ecdisteróide, pois o nível de ecdisteróide da hemolinfa de operárias adultas é muito menor do que durante o desenvolvimento (PAUL et al., 2006). Apesar disso, o receptor de ecdisona (EcR) também foi suprarregulado, sugerindo uma ação sinérgica entre a expressão desses genes.

HSP90 e Cdc37 formam um grupo de genes que estão envolvidos no acompanhamento de neurônios cerebrais, conhecidos também como chaperonas, que são capazes de realizar o desenovelamento de proteínas permitindo que as mesmas desempenhem suas funções de forma adequada; além disso, podem reparar proteínas mal enroladas ou instáveis (CATAE et al., 2018). Nesse sentido, o aumento da expressão desses genes no presente estudo sugere que o glifosato pode induzir à desnaturação de proteínas neurais no cérebro das abelhas contaminadas. No entanto, esses genes podem atuar independentemente. Cdc37 interage com muitas quinases, estando envolvido em muitos processos celulares (junto ou não com HSP90), incluindo ácido desoxirribonucleico e síntese de proteínas, regulação do ciclo celular, transdução de sinal e transcrição (MACLEAN e PICARD, 2003). Já as HSP90 são proteínas de choque térmico relacionadas ao estresse, sendo superexpressa quando os organismos são expostos a choque térmico ou outros estressores ambientais, como pesticidas (XU et al., 2010).

Após quatro horas de exposição ao glifosato, observou-se alteração na expressão de genes relacionados aos processos metabólicos e biossintéticos, sugerindo atuação da molécula desse herbicida na microbiota intestinal das abelhas, uma vez que o papel da microbiota bem estabelecida e equilibrada na saúde desses insetos está associada a nutrição, digestão e metabolização de alimentos, biossíntese de nutrientes, incluindo a fermentação de carboidratos complexos e açúcares que não são digeríveis pela própria abelha, desintoxicação, proteção contra patógenos oportunistas e, conseqüentemente, desenvolvimento da imunidade (ENGEL et al., 2012; KWONG e MORAN, 2016; RODRIGUES et al., 2021). A alteração destas vias pode ter ocorrido devido as bactérias intestinais das abelhas possuírem a enzima alvo do glifosato (EPSPs) (MOTTA et al., 2018). Segundo Kwong e Moran (2016), a microbiota intestinal das abelhas é dominada por nove espécies bacterianas, dentre elas, cinco aglomerados de espécies bacterianas principais e quatro membros menos numerosos. Essa microbiota é adquirida, principalmente, por meio de interações sociais com outras abelhas operárias durante os primeiros dias de vida após o nascimento (RODRIGUES et al., 2021).

Diversos estudos têm demonstrado que o glifosato pode perturbar a microbiota intestinal das abelhas, causando não somente disbiose (MOTTA et al., 2018; BLOT et al., 2019; MOTTA e MORAN, 2020; MOTTA et al., 2020), como também pode alterar vias de resposta imune, infraregulando a expressão de peptídeos antimicrobianos (AMPs) produzidos pelas abelhas (MOTTA et al., 2022). De acordo com os autores, a produção de AMP é um dos componentes principais do sistema imune inato das abelhas, e a interrupção de suas vias pode promover consequências negativas à sua saúde.

O gene Def1 ou defensina1 está relacionado a defesa imunológica das abelhas e possui níveis de expressão muito altos nesses insetos (SHI et al., 2017); no entanto, nesse experimento foi encontrado uma infraregulação induzida pelo glifosato em abelhas expostas por 4 horas, podendo estar associado a ineficiência do sistema imunológico e defesa contra patógenos provocadas pelo herbicida. Zhao et al. (2020) utilizando glifosato comercial sobre *A. mellifera ligustica* e *A. cerana cerana* observaram supraregulação para esse gene, mostrando que esse produto induziu as abelhas a mitigar seus efeitos nocivos. Essa divergência dos resultados pode ser explicada devido ao agrotóxico utilizado neste estudo ser puro ao invés de formulações comerciais. Dessa forma, é possível que outros componentes presentes nas formulações possam promover essa supraregulação desse gene.

O gene A4 codificador da apolipoforina-III que é abundantemente expresso em glândulas mandibulares de abelhas (WU et al., 2017), foi infraregulado pela ação do glifosato neste trabalho. A apolipoforina III auxilia no carregamento do diacilglicerol, gerado a partir dos

estoques de triacilglicerol no corpo gorduroso através da ação do hormônio adipocinético, em lipoforina, a lipoproteína da hemolinfa; além disso, aumenta a capacidade de transporte de lipídios da lipoforina, cobrindo a superfície hidrofóbica em expansão resultante da captação de diacilglicerol. Desempenha um papel crítico no transporte de lipídios durante o voo de insetos e também pode desempenhar um papel nos mecanismos de defesa e na imunidade inata (NCBI). Assim, sugere-se que sua baixa expressão estaria relacionada a ineficiência do organismo na defesa contra a ação do agente estressor.

O gene CSP1 está incluso nas proteínas quimiossensoriais (CSPs) envolvidas na comunicação química das abelhas (NCBI) e apresentou aumento na sua expressão após 4 horas de exposição ao glifosato. Liu et al. (2020) sugerem que os CSPs têm ações complexas não apenas no sistema imunológico do inseto, mas também no sistema nervoso central e em praticamente todos os órgãos do corpo, tendo sua expressão enriquecida na cabeça, especificamente no cérebro, podendo estar relacionado ao transporte facilitado de ácidos graxos e vias mediadas por lipídios para adaptação, sinalização e defesa imunológica. Ainda, é proposto por esses autores que os genes da família CSP ativam a via do ômega 6 para produzir diacilglicerol (DAG), ativando a fosfolipase quinase C e a fosforilação de outras proteínas. Essa fosforilação está relacionada não apenas a despolarização/repolarização dos neurônios (canais de sódio/potássio), transdução de sinal (receptor transmembrana) e/ou contração muscular (proteína motora da miosina), mas também para a ativação de lipídios biossintéticos e degradativos, enzimas são essenciais para a degradação de xenobióticos, armazenamento de ácidos graxos e produção de feromônios.

A exposição das forrageiras ao glifosato induziu a redução na expressão de genes que normalmente são superexpressos em abelhas nutrízes. Os genes da proteína da geleia real (MRJPs e Y-h) foram infraregulados após 1 e 4 horas de exposição ao glifosato, exceto Y-h que foi expresso após 4 horas apenas. Com base nestes resultados, pode-se inferir que a contaminação de abelhas na fase de nutrízes com doses letais ou subletais do glifosato poderia afetar a quantidade e qualidade da geleia produzida, afetando a nutrição, alterações comportamentais e desenvolvimento da colônia como um todo (FENT et al., 2020).

Pode-se concluir que o herbicida glifosato afeta a expressão gênica de abelhas melíferas na fase de campeiras expostas de forma aguda ou crônica, podendo afetar importantes vias metabólicas, interferindo na microbiota e defesa contra patógenos, bem como prejudicar vias do sistema nervoso, acarretando na disfunção do sistema cognitivo e, consequentemente, no desenvolvimento e atividades da colônia.

Referências

- ALIOUANE, Y.; EL HASSANI, A.K; GARY, V.; ARMENGAUD, C.; LAMBIN, M.; GAUTHIER, M. Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**. v.28, n.1, p.113-122, 2009.
- ALMASRI, H.; TAVARES, D.A.; DIOGON, M.; PIOZ, M.; ALAMIL, M.; SENÉ, D.; TCHAMITCHIAN, S.; COUSIN, M.; BRUNET, J-C.; BELZUNCES, L.P. Physiological effects of the interaction between *Nosema ceranae* and sequential and overlapping exposure to glyphosate and difenoconazole in the honey bee *Apis mellifera*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.217, p.112258, 2021.
- BALBUENA, M.S.; TISON, L.; HAHN, M.L.; GREGGERS, U.; MENZEL, R.; FARINA, W.M. Effects of sub-lethal doses of glyphosate on honeybee navigation. **The Journal of Experimental Biology**. v.218, n.17, p.2799-2805, 2015.
- BATTISTI, L.; POTRICH, M.; SAMPAIO, A.R.; GHISI, N.C.; COSTA-MAIA, F.M.; ABATI, R.; MARTINEZ, C.B.R.; SOFIA, S.H. Is glyphosate toxic to bees? A meta-analytical review. **Science of the Total Environment**. v.767, p.145397, 2021.
- BISWAS, S.; REINHARD, J.; OAKESHOTT, J.; RUSSELL, R.; SRINIVASAN, M. V.; CLAUDIANOS, C. Sensory regulation of neuroligins and neurexin I in the honeybee brain. **Plos one**. v.5, n.2, p.e9133, 2010.
- BLOT, N.; VEILLAT, L.; ROUZÉ, R.; DELATTE, H. Glyphosate, but not its metabolite AMPA, alters the honeybee gut microbiota. **PLoS ONE**: v.14, n.4, e0215466, 2019.
- BOILY, M.; SARRASIN, B.; DEBLOIS, C.; ARAS, P.; CHAGNON, M. Acetylcholinesterase in honey bees (*Apis mellifera*) exposed to neonicotinoids, atrazine and glyphosate: laboratory and field experiments. **Environmental Science and Pollution Research**. v.20, n.8, p.5603-5614, 2013.
- CAMILLI, M P.; KADRI, S.M.; ALVAREZ, M.V.N.; RIBOLLA, P.E.M.; ORSI, R.O. Zinc supplementation modifies brain tissue transcriptome of *Apis mellifera* honeybees. **BMC genomics**. v.23, n.1, p.1-13, 2022.
- CASIDA, J.E.; DURKIN, K.A. Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. **Annual Review of Entomology**. v.58, n.1, p.99-117, 2013.
- CATAE, A.F.; DA SILVA MENEGASSO, A.R.; PRATAVIEIRA, M.; PALMA, M.S.; MALASPINA, O.; ROAT, T.C. MALDI-imaging analyses of honeybee brains exposed to a neonicotinoid insecticide. **Pest management science**. v.75, n.3, p.607-615, 2019.
- CHRISTEN, V.; MITTNER, F.; FENT, K. Molecular effects of neonicotinoids in honey bees (*Apis mellifera*). **Environmental Science & Technology**. v.50, n.7, p.4071-4081, 2016.
- CHOMCZYNSKI P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **Biotechniques**. v.15, n.3, p.532-4, 536-7, 1993.

COX, C. Human exposure and ecological effects. **Journal of Pesticide Reform**. v.15, n.4, 1995.

DAI, P.; YAN, Z.; MA, S.; YANG, Y.; WANG, Q.; HOU, C.; WU, Y.; LIU, Y.; DIAO, Q. The Herbicide Glyphosate Negatively Affects Midgut Bacterial Communities and Survival of Honey Bee during Larvae Reared in Vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.66, p.7786-7793, 2018.

DENG, Y.; YAN, H.; GU, J.; XU, J.; WU, K.; TU, Z.; JAMES, A.A.; CHEN, X. Molecular and functional characterization of odorant-binding protein genes in an invasive vector mosquito, *Aedes albopictus*. **Plos one**, v.8, n.7, p.e68836, 2013.

DILL, G.M.; SAMMONS, R.D.; FENG, P.C.C.; KOHN, F.; KRETZMER, K.; MEHRSHIEKH, A.; HONEGGER, M.B.J.L.; FARMER, D.; WRIGHT, D.; HAUPFEAR, E.A. Glyphosate: discovery, development, applications, and properties. In: NADULA, V.K. **Glyphosate resistance in crops and weeds: history, development, and management**. p.1-33, 2010.

DUKE, D. Glyphosate: Environmental fate and impact. **Weed Science**. v.68, n.3, p.201-207, 2020.

EL HASSANI, A.K.; SCHUSTER, S.; DYCK, Y.; DEMARES, F.; LEBOULLE, G.; ARMENGAUD, C. Identification, localization and function of glutamate-gated chloride channel receptors in the honeybee brain. **European Journal of Neuroscience**. v.36, n.4, p.2409-2420, 2012.

EL-SEBAE, A.H.; EL SHATBY, A.; JANSSEN, E.D.P.; MENSINK, H. Environmental Health Criteria 159 - Glyphosate. **Biodegradation**, v.4, 1994.

ENGEL, P.; MARTINSON, V.G.; MORAN, N.A. Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.109, n.27, p.11002-11007, 2012.

FARINA, W.M.; BALBUENA, M.S.; HERBERT, L.T.; GOÑALONS, C.M.; VÁZQUEZ, D.E. Effects of the herbicide glyphosate on honey bee sensory and cognitive abilities: Individual impairments with implications for the hive. **Insects**, v.10, n.10, p.354, 2019.

FENT, K.; HALTINER, T.; KUNZ, P.; CHRISTEN, V. Insecticides cause transcriptional alterations of endocrine related genes in the brain of honey bee foragers. **Chemosphere**. v.260, p.127542, 2020.

GAUTHIER, M.; GRÜNEWALD, B. Neurotransmitter systems in the honey bee brain: functions in learning and memory. In: GALIZIA, C.G.; EISENHARDT, D.; GIURFA, M. (Eds.). **Honeybee neurobiology and behavior: a tribute to Randolph Menzel**. Springer Science & Business Media, p. 155-169, 2012.

GEHRING, K.B.; HEUFELDER, K.; DEPNER, H.; KERSTING, I.; SIGRIST, S.J.; EISENHARDT, D. Age-associated increase of the active zone protein Bruchpilot within the honeybee mushroom body. **PloS one**. v.12, n.4, p.e0175894, 2017.

GILL, J.P.K.; SETHI, N.; MOHAN, A.; DATTA, S.; GIRDHAR, M. Glyphosate toxicity for animals. **Environmental Chemistry Letters**. v.16, n.2, p.401-426, 2018.

GUPTA, D.; CHAUHAN, H.; GUPTA, S.; GUPTA, R. Effect of Colony Collapse Disorder on Honeybees. **Journal of Computational and Theoretical Nanoscience**. v.16, n.10, 2019.

HELMER, S.H.; KERBAOL, A.; ARAS, P.; JUMARIE, C.; BOILY, M. Effects of realistic doses of atrazine, metolachlor, and glyphosate on lipid peroxidation and diet-derived antioxidants in caged honey bees (*Apis mellifera*). **Environmental Science and Pollution Research**. v.22, p.8010–8021, 2015.

HERBERT, L.T.; VÁZQUEZ, D.E.; ARENAS, A.; FARINA, W.M. Effects of field-realistic doses of glyphosate on honeybee appetitive behaviour. **The Journal of Experimental Biology**. v.217, n.19, p.3457- 3464, 2014.

JOHNSON, R.M. Honey bee toxicology. **Annual Review Entomology**. v.60, n.1, p.415-434, 2014.

JUMARIE, C.; ARAS, P.; BOILY, M. Mixtures of herbicides and metals affect the redox system of honey bees. **Chemosphere**. v.168, p.163-170, 2017.

KILANI, M. Biology of the honeybee. In: COLIN, M.E.; BALL, B.V.; KILANI, M. (eds.). **Bee disease diagnosis**. Options Méditerranéennes. Série B: Etudes et Recherches. Zaragoza: CIHEAM, n.25, p.9-24, 1999.

KIM, S.; KIM, K.; LEE, J.H.; HAN, S.H.; LEE, S.H. Differential expression of acetylcholinesterase 1 in response to various stress factors in honey bee workers. **Scientific reports**. v.9, n.1, p.1-10, 2019.

KITTEL, R.J.; WICHMANN, C.; RASSE, T.M.; FOUQUET, W.; SCHMIDT, M.; SCHMID, A.; WAGH, D.A.; PAWLY, C.; KELLNER, R.R.; WILLIG, K.I.; INFERNO, S.W.; BUCHNER, E.; HECKMANN, M.; SIGRIST, S.J. Bruchpilot promotes active zone assembly, Ca²⁺ channel clustering, and vesicle release. **Science**. v.312, n.5776, p.1051-1054, 2006.

KWONG, W.K.; MORAN, N.A. Gut microbial communities of social bees. **Nature reviews microbiology**, v.14, n.6, p.374-384, 2016.

LEBOULLE, G. Glutamate neurotransmission in the honey bee central nervous system. In: GALIZIA, C.G.; EISENHARDT, D.; GIURFA, M. (Eds.). **Honeybee Neurobiology and Behavior: a tribute to Randolph Menzel**. Springer Science & Business Media. p. 171-184, 2012.

LIAO, L.H.; WU, W.Y.; BERENBAUM, M.R. Behavioral responses of honey bees (*Apis mellifera*) to natural and synthetic xenobiotics in food. **Scientific Reports**. v.7, n.1, p.1-8, 2017.

LIU, G.; XUAN, N.; RAJASHEKAR, B.; ARNAUD, P.; OFFMANN, B.; PICIMBON, J.F. Comprehensive history of CSP genes: Evolution, phylogenetic distribution and functions. **Genes**. v.11, n.4, p.413, 2020.

LUO, Q-H.; GAO, J.; GUO, Y.; LIU, C.; MA, Y-Z.; ZHOU, Z-Y.; DAI, P-P.; HOU, C-S.; WU, Y-Y.; DIAO, Q-Y. Effects of a commercially formulated glyphosate solutions at recommended concentrations on honeybee (*Apis mellifera* L.) behaviours. **Scientific Reports**, v.11, n.1, p.1-8, 2021.

MACLEAN, M.; PICARD, D. Cdc37 goes beyond Hsp90 and kinases. **Cell stress & chaperones**. v.8, n.2, p.114, 2003.

MAGGI, F.; LA CECILIA, D.; TANG, F.H.; MCBRATNEY, A. The global environmental hazard of glyphosate use. **Science of the Total Environment**. v.717, p.137167, 2020.

MATSUMURA, Y.; TO, T.K.; KOHNO, H.; KAKUTANI, T.; KUBO, T. Mblk-1/E93, an ecdysone related-transcription factor, targets synaptic plasticity-related genes in the honey bee mushroom bodies. PREPRINT (Version 1), **Research Square**, 2022.

MAYACK, C.; RÜKÜN, T.; ERCAN, N.; CANKO, E.; AVŞAR, B.; DYER, A.; GARCIA, J.; ÇAKMAK, İ. Sub-lethal pesticide exposure erases colour vision memory and affects flower constancy in foraging honey bees. PREPRINT (Version 1), **Research Square**, 2021.

MOTTA, E.V.S.; RAYMANN, K.; MORAN, N.A. Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees. **PNAS**. v.115, n.41, p.10305-10310, 2018.

MOTTA, E.V.S.; MORAN, N.A. Impact of glyphosate on the honey bee gut microbiota: effects of intensity, duration, and timing of exposure. **mSystems**. v.5, n.4, e00268-20, 2020.

MOTTA, E.V., MAK, M.; DE JONG, T.K.; POWELL, J.E.; O'DONNELL, A.; SUHR, K.J.; RIDDINGTON, I.M.; MORAN, N.A. Oral or topical exposure to glyphosate in herbicide formulation impacts the gut microbiota and survival rates of honey bees. **Applied and environmental microbiology**, v. 86, n.18, p.e01150-20, 2020.

MOTTA, E.V.S.; POWELL, J.E.; MORAN, N.A. Glyphosate induces immune dysregulation in honey bees. **Animal microbiome**: v.4, n.1, p.1-14, 2022.

PAUL, R.K.; TAKEUCHI, H.; KUBO, T. Expression of two ecdysteroid-regulated genes, Broad-Complex and E75, in the brain and ovary of the honeybee (*Apis mellifera* L.). **Zoological science**. v.23, n.12, p.1085-1092, 2006.

PENG, I-F.; WU, C-F. *Drosophila cacophony* channels: a major mediator of neuronal Ca^{2+} currents and a trigger for K^{+} channel homeostatic regulation. **Journal of Neuroscience**. v.27, n.5, p.1072-1081, 2007.

REINHARD, J.; CLAUDIANOS, C. Molecular Insights into Honey Bee brain plasticity. In: GALIZIA, C.G.; EISENHARDT, D.; GIURFA, M. (Eds.). **Honeybee neurobiology and behavior: a tribute to Randolph Menzel**. Springer Science & Business Media, p. 359-372, 2012.

REISSNER, C.; RUNKEL, F.; MISSLER, M. Neurexins. **Genome biology**. v.14, n.9, p.1-15, 2013.

RICHMOND, M.E. Glyphosate: a review of its global use, environmental impact, and potential health effects on humans and other species. **Journal of Environmental Studies and Sciences**. v.8, n.4, p.416-434, 2018.

ROAT, T.C.; DOS SANTOS-PINTO, J.R.A.; SANTOS, L.D.; SANTOS, K.S.; MALASPINA, O.; PALMA, M.S. Modification of the brain proteome of Africanized honeybees (*Apis mellifera*) exposed to a sub-lethal doses of the insecticide fipronil. **Ecotoxicology**: v.23, n.9, p.1659-1670, 2014. DOI 10.1007/s10646-014- 1305-8

RODRIGUES, S.P.; DA SILVA, J.C.I.; DE OLIVEIRA, T.C.; DA SILVA, L.I.; MENEZES, N.C. O papel da microbiota bacteriana intestinal de abelhas eussociais: uma revisão de literatura. **Research, Society and Development**, v.10, n.14, p.e30101421623-e30101421623, 2021.

SÁNCHEZ-BAYO, F.; WYCKHUYS, K.A.G. Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers. **Biological Conservation**. v.232, p.08-27, 2019.

SHI, T.F.; WANG, Y.F.; LIU, F.; QI, L.; YU, L.S. Sublethal effects of the neonicotinoid insecticide thiamethoxam on the transcriptome of the honey bees (Hymenoptera: Apidae). **Journal of economic entomology**. v.110, n.6, p.2283-2289, 2017.

TAKAYANAGI-KIYA, S.; KIYA, T.; KUNIEDA, T.; KUBO, T. Mblk-1 transcription factor family: its roles in various animals and regulation by NOL4 splice variants in mammals. **International journal of molecular sciences**. v.18, n.2, p.246, 2017.

TAN, S.; LI, G.; LIU, Z.; WANG, H.; GUO, X.; XU, B. Effects of glyphosate exposure on honeybees. **Environmental toxicology and pharmacology**, v.90, p.103792, 2022.

THOMPSON, H.M.; HUNT, L.V. Extrapolating from Honeybees to Bumblebees in Pesticide Risk Assessment. **Ecotoxicology**: v.8, p.147-166, 1999.

VÁZQUEZ, D.E.; ILINA N.; PAGANO E.A.; ZAVALA, J.A.; FARINA, W.M. Glyphosate affects the larval development of honey bees depending on the susceptibility of colonies. **PLoS ONE**. v.13, n.10, e0205074, 2018.

VÁZQUEZ, D.E.; BALBUENA, M.S.; CHAVES, F.; GORA, J.; MENZEL, R.; FARINA, W.M. Sleep in honey bees is affected by the herbicide glyphosate. **Scientific Reports**. v.10, 2020a.

VÁZQUEZ, D.E.; LATORRE-ESTIVALIS, J.M.; ONS, S.; FARINA, W.M. Chronic exposure to glyphosate induces transcriptional changes in honey bee larva: A toxicogenomic study. **Environmental Pollution**. v.261, 2020b.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature reviews genetics**. v.10, n.1, p.57-63, 2009.

WU, Y.; ZHENG, H.; CORONA, M.; PIRK, C.; MENG, F.; ZHENG, Y.; HU, F. Comparative transcriptome analysis on the synthesis pathway of honey bee (*Apis mellifera*) mandibular gland secretions. **Scientific reports**. v.7, n.1, p.1-10, 2017.

XU, P.J.; XIAO, J.H.; XIA, Q.Y.; MURPHY, B.; HUANG, D.W. *Apis mellifera* has two isoforms of cytoplasmic HSP90. **Insect molecular biology**. v.19, n.4, p.593-597, 2010.

ZALUSKI, R.; KADRI, S.M.; ALONSO, D.P.; RIBOLLA, P.E.M.; ORSI, R.O. Fipronil promotes motor and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) and affects the development of colonies exposed to sublethal doses. **Environmental toxicology and chemistry**. v.34, n.5, p.1062-1069, 2015.

ZHAO, H.; LI, G.; GUO, D.; WANG, Y.; LIU, Q.; GAO, Z.; WANG, H.; LIU, Z.; GUO, X.; XU, B. Transcriptomic and metabolomic landscape of the molecular effects of glyphosate commercial formulation on *Apis mellifera ligustica* and *Apis cerana cerana*. **Science of The Total Environment**. v.744, p.140819, 2020.